响应面法优化黑水虻幼虫蛋白质提取工艺

许彦腾，张建新*，宋真真，孙 勇

（西北农林科技大学食品科学与工程学院，陕西杨凌 712100）

摘要：【目的】对黑水虻 *Hermetia illucens* 幼虫蛋白质进行不同提取方法的比较，选择最优提取方法，并确定其最优工艺参数，为黑水虻幼虫蛋白提取与资源利用提供依据。【方法】以黑水虻幼虫为原料，分别采用碱提法、酶提法、盐提法和 Tris-HCl 缓冲液提法对黑水虻幼虫蛋白质进行提取，并比较分析。通过单因素试验分别确定 NaOH 质量浓度、液料比、提取温度及提取时间 4 个因素的较优水平。在单因素试验结果基础上，按照 Box-Behnken 响应面试验设计进行响应面优化试验。【结果】提取黑水虻幼虫蛋白质的 4 种方法中碱提法的提取率最高，最佳提取条件为：NaOH 质量浓度 2.44 g/100mL，液料比 22 mL/g，提取温度 53℃，提取时间 2 h。提取率验证试验结果为 88.49%，与预测值相对误差为 0.28%。【结论】响应面模型拟合度高，优化出的最佳提取工艺可行。

关键词：黑水虻；蛋白质提取；碱提法；酶提法；盐提法；Tris-HCl 缓冲液提法；响应面；工艺优化

中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2014)04-0401-10

Optimization of extraction of proteins from larvae of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae), using response surface methodology

XU Yan-Teng, ZHANG Jian-Xin*, SONG Zhen-Zhen, SUN Yong (College of Food Science and Engineering, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Aim】To compare four different extraction methods of proteins from larvae of the black soldier fly, *Hermetia illucens*, choose the method with highest extraction rate, and obtain the optimum process parameters so as to provide reference to protein extraction and resource utilization of *H. illucens*. 【Methods】The methods of extraction by lye, enzyme, salt and Tris-HCl buffer were used and comparatively analyzed in extracting proteins from larvae of the black soldier fly. Then, the optimum levels of NaOH mass concentration, liquid-to-solid ratio, extraction temperature and time were determined by means of single factor tests. The experiment and analysis of Box-Behnken response surface was conducted based on the results of univariate tests and the actual situation. 【Results】Among the four extraction methods of proteins from black soldier fly larvae, lye extraction was optimal, with the optimum extraction conditions of NaOH mass concentration 2.44 g/100 mL, liquid-to-solid ratio 22 mL/g, extraction temperature 53℃ and extraction time 2 h. The corresponding extraction ratio of verification test was 88.49%, with the relative error of only 0.28% compared with predictive value. 【Conclusion】The response surface model is good fit, and the optimum extraction process is feasible.

Key words: *Hermetia illucens*; protein extraction; lye extraction; enzyme extraction; salt extraction; Tris-HCl buffer extraction; response surface methodology; process optimization

黑水虻 *Hermetia illucens*（black soldier fly），是双翅目水虻科的一种昆虫，习性与家蝇类似，原分布地为美洲，目前已在全世界的温带、亚热带与热带地区广泛分布。在我国，黑水虻主要分布在的海南、广东、广西、福建、云南、四川、河北及北京等地区（柴志强等，2012；沈媛等，2012）。黑水虻幼虫陆生，营腐食性生活，取食范围非常广泛，除骨骼与几丁质外，几乎能够消化所有的固体有机废弃物，在自然界食物链中扮演重要角色，是畜禽粪便、餐厨垃圾、食品加工下脚料、腐烂果疏及陈粮等有机废弃物的生

基金项目：西北农林科技大学科研合作项目(2013-19)
作者简介：许彦腾，男，1989 年生，河北辛集人，硕士研究生，主要从事食品营养与安全研究，E-mail：xuyanteng89@gmail.com
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：zhangjx59@foxmail.com
收稿日期 Received：2013-12-16；接受日期 Accepted：2014-03-18

物处理的重要媒介之一(李志刚等, 2011)。以黑水虻为主体功能要素构建的生态处理系统,能将污染人类生存环境的固体有机废弃物快速、安全、高效地转化为高附加值的昆虫蛋白(Newton *et al.*, 2005; Lalander *et al.*, 2013)。蛋白质是构成生命体的物质基础,几乎所有形式的生命活动都与蛋白质有关。然而,蛋白质资源不足早已是当今世界面临的一大危机(张文庆等, 2008; 刘高强和魏美才, 2008)。昆虫作为地球上储量巨大的蛋白资源宝库,具有巨大的开发利用潜力,并且有研究表明昆虫蛋白具有抗疲劳、抗衰老、降血脂、抗癌及提高人体免疫力等功效(郭倩等, 2011)。因此,对黑水虻幼虫进行蛋白质提取可为其规模化饲养和昆虫蛋白功能特性的进一步研究提供一定的数据参考,有利于变废为宝,实现可持续发展的循环经济模式。

目前,最常用的昆虫蛋白质提取方法有碱提法(赵晨霞等, 2013)、酶提法(王燕, 2012)、盐提法(金会鑫等, 2012)和水提法(缓冲溶液提取法)(聂路等, 2011)4 种方法,其中以蛋白质提取率较高的碱提法和酶提法最为常见。国内外有关黑水虻的研究还主要集中在餐厨垃圾和畜禽粪便的处理、有机肥料和渔牧业饲料的生产及环境安全评估等方面(Newton *et al.*, 2005; Diener *et al.*, 2009; 喻国辉等, 2009),近年也有部分学者对其进行了生物柴油(Li *et al.*, 2011a, 2011b)和抗菌物质(Erickson *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2012; 夏嫱等, 2013)方面的研究,并取得了初步进展。虽然国内外已有关于黄粉虫 *Tenebrio molitor*、迁粉蝶 *Catopsilia* spp. 幼虫、大麦虫 *Zophobas morio*、丰年虫 *Chirocephalus diaphanous*、蝗虫和蚕蛹等昆虫蛋白质的研究报道,但是对具有较高的环保和经济效益的黑水虻研究蛋白质营养价值的的研究还处于初步探索阶段,有关黑水虻幼虫蛋白质的提取分离及利用研究还未见报道。

本研究分别采用碱提法、酶提法、盐提法和 Tris-HCl 缓冲液提法对黑水虻幼虫蛋白质进行提取,以提取率为主要指标,通过比较筛选,确定最佳的提取方法。并依次通过单因素试验和响应面法对提取工艺条件进行优化,以确定黑水虻幼虫蛋白的最佳提取工艺参数。

1 材料与方法

1.1 试虫与试剂

黑水虻幼虫由西安洁姆环保科技有限公司提供;胰蛋白酶(酶比活力≥250 U/mg),美国 Amresco 公司;BCA 蛋白定量试剂盒,北京康为世纪生物科技有限公司;牛血清蛋白,瑞士 Roche 公司;硫酸铜、硫酸钾、硼酸、浓硫酸、苯酚、乙醇(95%)、石油醚(30～60℃沸程)、氢氧化钠、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、浓盐酸、氯化钠等化学试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器与设备

101-2 电热鼓风干燥箱,北京科伟永兴仪器有限公司;JP-100A-2 高速多功能粉碎机,上海市久品工贸有限公司;FOSS-2300 定氮仪,FOSS 瑞典特卡托公司;100 目标准检验筛(孔径 0.15 mm),浙江省上虞市大亨桥化验仪器厂;FA2004 分析天平,北京赛多利斯仪器系统有限公司;HH-2 电热恒温水浴锅,北京科伟永兴仪器有限公司;ZDJ-4A 型自动电位滴定仪,上海精密科学仪器有限公司;HJ-3 恒温磁力加热搅拌器,常州国华电器有限公司;C20L-822A 多功能电磁炉,广东志高空调股份有限公司;SC-3610 低速离心机,安徽中科中佳科学仪器有限公司;UV-2550 紫外分光光度计,日本岛津公司。

1.3 黑水虻幼虫脱脂粉的制备

黑水虻幼虫于 40℃鼓风干燥至质量恒定,粗粉碎,40℃索氏抽提 12 h 脱脂,室温风干至恒重,粉碎过筛,密封,4℃保藏备用。

1.4 测定黑水虻幼虫主要营养成分的测定

分别对黑水虻幼虫全粉与脱脂粉进行主要营养成分测定。水分测定参照 GB5009.3-2010《食品中水分的测定》;灰分测定参照 GB5009.4-2010《食品中灰分的测定》;蛋白测定参照 GB5009.5-2010《食品中蛋白质的测定》;脂肪测定参照 GB/T5009.6-2003《食品中脂肪的测定》;碳水化合物测定参照 GB/T9695.31-2008《肉制品总糖含量测定》。

1.5 不同方法对黑水虻幼虫蛋白质的提取

碱提法参照赵晨霞等方法(2013),并略作修改,取 2 g 黑水虻幼虫脱脂粉,加入 10 倍体积 1 g/100 mL NaOH 溶液,于 60℃搅拌提取 2 h;酶提法参照王燕(2012)方法,并略作修改,取 2 g 脱脂粉,加入 20 倍体积 2 g/100 mL 胰蛋白酶溶液(pH 值 7.5),于 37℃搅拌提取 2 h,期间分别用 0.1 mol/L NaOH 溶液和 0.1 mol/L HCl 溶液调节 pH 值,使溶液保持 pH 值为 7.5,之后沸水浴 10 min 灭酶;盐提法参照金会鑫等方法(2012),并略作修改,取 2 g 脱脂粉,加入 10 倍体积 1.5 g/100 mL NaCl 溶液,于 40℃搅拌提取 2 h;Tris-HCl 缓冲液提法参照聂路等方法(2011),并略作修改,取 2 g 脱脂粉,加入 10 倍

体积 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液(pH 值 7.4),于 50℃搅拌提取 2 h。提取完毕后,4 800 r/min 离心 10 min,取上清液,用蒸馏水定容至 250 mL 作为待测液。待测液中蛋白质含量按照试剂盒说明书采用 BCA 法进行测定。

黑水虻幼虫蛋白提取率(%)=(上清液中蛋白质量/脱脂粉中蛋白质量)×100。

1.6　蛋白质提取的优化

依次研究 NaOH 质量浓度、液料比、提取温度、提取时间对黑水虻幼虫蛋白质提取率的影响。在此单因素试验结果基础上,以这 4 个因素为考察变量,采用四因素三水平 Box-Behnken 响应面试验设计方案,进行蛋白质提取工艺优化。试验因素水平设计见表 1。

表 1　响应面试验设计因素水平编码表

Table 1　Encoding of the factors and levels used in response surface experimental design

因素 Factors	编码 Codes	水平 Levels		
		−1	0	1
X_1：NaOH 质量浓度 NaOH mass concentration (g/100mL)	A	2.00	2.25	2.50
X_2：液料比 Liquid-to-solid ratio (mL/g)	B	15	20	25
X_3：提取温度 Extraction temperature (℃)	C	40	50	60
X_4：提取时间 Extraction time (h)	D	1.5	2.0	2.5

$A=4(X_1-2.25)$；$B=0.2(X_2-20)$；$C=0.1(X_3-50)$；$D=2(X_4-2)$.

1.7　数据分析

所有试验均重复 3 次。常规数据处理软件为 Excel2007,显著性检验软件为 Mintab16,相同字母代表无显著差异($P>0.05$)。响应面试验设计与统计分析软件为 Design-Expert 8.0.6.1。

2　结果与分析

2.1　黑水虻幼虫中的主要成分

黑水虻幼虫与脱脂粉主要成分相对含量见表 2。由表 2 可知,黑水虻幼虫和脱脂粉中蛋白质含量丰富,其中脱脂粉中蛋白质相对含量高达 57.7%,故黑水虻幼虫可作为蛋白质的生产原料。

2.2　提取方法的选择

由图 1(A)可知,4 种不同的黑水虻幼虫蛋白质提取方法中,碱提法的提取率最高(56.45%),其次是酶提法(54.09%),盐提法和 Tris-HCl 缓冲液提法最低,分别为 14.51% 和 11.23%。酶提法虽然提取率较高,但在提取黑水虻幼虫蛋白质的同时加入了同为蛋白质的胰蛋白酶,影响所提蛋白质的纯度,并且酶提法利用酶解的原理,很大程度上将黑水虻幼虫蛋白质水解为小分子多肽。盐提法和 Tris-HCl 缓冲液提法虽然条件温和,但提取率明显低于前两种方法。综上,本研究选择碱提法对黑水虻幼虫进行蛋白质的提取。

2.3　黑水虻幼虫蛋白质提取单因素试验结果

2.3.1　NaOH 质量浓度对蛋白质提取率的影响:选取不同 NaOH 质量浓度,分别在液料比为 10 mL/g,提取温度为50℃,提取时间为1.5 h的条件下对黑水虻幼虫蛋白质进行提取,结果见图 1(B)。由图 1(B)可知,NaOH 质量浓度对黑水虻幼虫蛋白质提取率的影响很大,蛋白质的提取率开始时随着 NaOH 质量浓度的增加呈明显上升趋势,原因可能是 NaOH 促进了蛋白质分子某些极性基团解离,使其表面带有相同电荷,从而增强蛋白质溶解性(沈莲清等, 2007)。当 NaOH 质量浓度达到 2.25 g/100 mL 后,蛋白质提取率趋于平缓,说明黑水虻蛋白质已大部分溶出,此时蛋白质提取率为 49.05%。虽然 NaOH 质量浓度在 3 g/100 mL 继续明显增加,但考虑到过高的 NaOH 含量会为之后的蛋白质脱盐增加工作量,并且可能导致蛋白质变性失活,颜色加

表 2　黑水虻幼虫与脱脂粉主要成分相对含量

Table 2　Relative content of the main components in *Hermetia illucens* larvae and defatted flour

原料 Raw material	相对含量 Relative content (%)				
	水分 Moisture	蛋白质 Proteins	脂肪 Fat	灰分 Ash	碳水化合物 Carbohydrates
黑水虻幼虫 *H. illucens* larvae	6.03 ±0.41	32.79 ±0.31	43.75 ±0.87	6.58 ±0.09	10.62 ±0.27
脱脂粉 Defatted flour	6.12 ±0.29	57.7 ±0.07	0.19 ±0.05	10.22 ±0.10	25.83 ±0.44

表中数值为平均值 ± 标准差。Data in the table are mean ± *SD*.

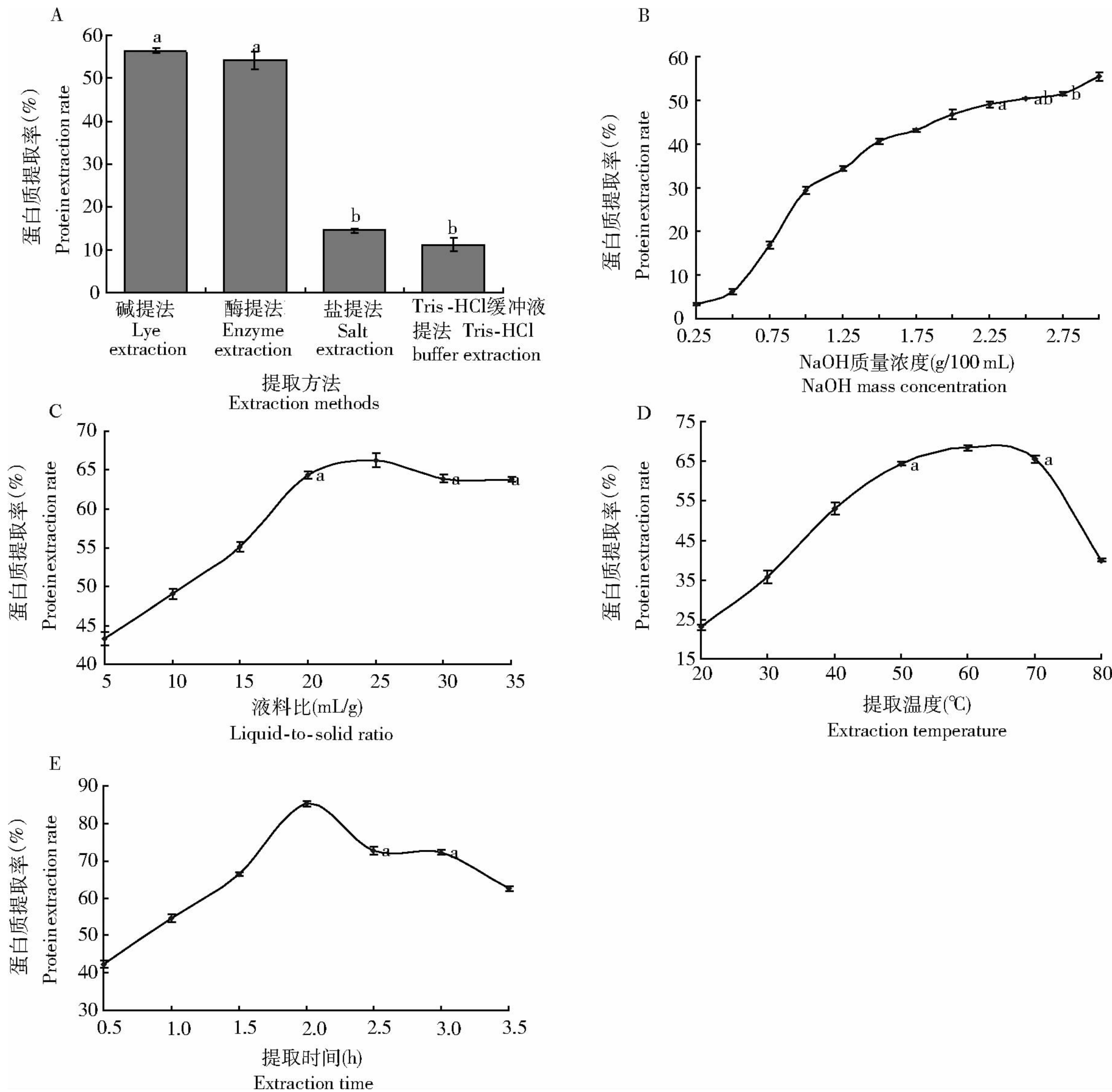


图 1 提取方法(A)、NaOH 质量浓度(B)、液料比(C)、提取温度(D)和提取时间(E)对黑水虻幼虫蛋白质提取率的影响

Fig. 1 Effects of extraction method (A), NaOH mass concentration (B), liquid-to-solid ratio (C), extraction temperature (D) and extraction time (E) on the extraction rate of proteins from *Hermetia illucens* larvae

图中数值为平均值 ± 标准差。Data in the figure are mean ± *SD*.

深,甚至产生有毒物质(Ansharullah *et al*., 1997),因此,选取 2.25 g/100 mL 为较佳的 NaOH 质量浓度。

2.3.2 液料比对蛋白质提取率的影响:选取不同的液料比,在 NaOH 质量浓度为 2.25 g/100 mL,提取温度为 50℃,提取时间为 1.5 h 的条件下提取黑水虻幼虫蛋白质,结果见图 1(C)。由图 1(C)可知,随着液料比的增加黑水虻幼虫蛋白质提取率逐渐上升,原因可能是随着液料比的增加,脱脂粉与碱提液的接触面积增加,液料之间蛋白质浓度差升高,有利于蛋白质溶出。当液料比达到 20 mL/g 时,蛋白质提取率达到 64.36%,之后趋于平缓。故选取 20 mL/g 作为较佳的液料比。

2.3.3 提取温度对蛋白质提取率的影响:选取不同的提取温度,在 NaOH 质量浓度为 2.25 g/100 mL,液料比为 20 mL/g,提取时间为 1.5 h 的条件下提取黑水虻幼虫蛋白质,结果见图 1(D)。由图 1(D)可知,50℃以前,黑水虻幼虫蛋白质提取率随着提取温度的升高逐渐上升,这可能由于温度的升高加快了分子之间的相互作用与运动速度,有利于蛋白质进入到碱提液中;50℃以后,蛋白质的提取率随着提取温度的升高而趋于平缓;80℃时蛋白质提取率急剧下降。这可能是因为过高的温度破坏了蛋白质原有结构,引起蛋白质不可逆变性(郭兴峰等, 2012),并与其他物质反应,降低了蛋白质的溶解性。综上,选

取50℃作为较佳的提取温度。

2.3.4 提取时间对蛋白质提取率的影响：选取不同的提取时间，NaOH 质量浓度为 2.25 g/100 mL，液料比为 20 mL/g，提取温度为 50℃的条件下提取黑水虻幼虫蛋白质，结果见图1(E)。由图1(E)可知，黑水虻幼虫蛋白质提取率随着时间的延长呈先上升后下降的趋势，2 h 时蛋白质提取率最高，达到 85.27%。原因可能是短时间内蛋白质还不能完全进入到碱提液中，随着时间的延长，蛋白质逐渐溶出，但是水分也会逐渐蒸发，导致液料比降低的同时，NaOH 质量浓度上升，并且蛋白质与 NaOH 作用的时间也会相应增加，引起蛋白质结构和性质的改变（刘野等，2013），最终降低了蛋白质的提取率。所以，选取 2 h 作为较佳的提取时间。

2.4 黑水虻幼虫蛋白质提取优化试验结果

2.4.1 响应面试验模型的建立与显著性检验：根据单因素试验结果，选取 NaOH 质量浓度、液料比、提取温度、提取时间 4 个因素作为自变量，以黑水虻幼虫蛋白质提取率作为响应值，进行 Box-Behnken 试验设计，其中 24 个析因点，5 次零点试验用以误差估计，试验结果见表3。

表3　Box-Behnken 试验设计与结果

Table 3　Box-Behnken experimental design and results

试验序号 No.	A	B	C	D	蛋白质提取率(%) Protein extraction rate
1	−1	−1	0	0	71.16
2	1	−1	0	0	83.37
3	−1	1	0	0	81.25
4	1	1	0	0	89.65
5	0	0	−1	−1	53.12
6	0	0	1	−1	71.36
7	0	0	−1	1	61.96
8	0	0	1	1	65.67
9	−1	0	0	−1	62.24
10	1	0	0	−1	64.35
11	−1	0	0	1	65.15
12	1	0	0	1	72.43
13	0	−1	−1	0	68.00
14	0	1	−1	0	85.45
15	0	−1	1	0	83.65
16	0	1	1	0	79.93
17	−1	0	−1	0	68.33
18	1	0	−1	0	75.77
19	−1	0	1	0	85.33
20	1	0	1	0	86.28
21	0	−1	0	−1	53.93
22	0	1	0	−1	70.29
23	0	−1	0	1	69.42
24	0	1	0	1	65.58
25	0	0	0	0	84.49
26	0	0	0	0	85.28
27	0	0	0	0	86.53
28	0	0	0	0	85.53
29	0	0	0	0	88.45

通过对试验设计与结果进行分析，获得相应的优化模型（表4）。线性模型和双因子交互模型的连续性不显著，失拟项却极显著，R^2_{Pre} 和 R^2_{Adj} 也明显均不符合要求，而 Box-Behnken 试验设计次数较少，不满足三次模型要求。二次模型的模型极显著，失拟项不显著，R^2_{Pre} 和 R^2_{Adj} 趋于一致并处在合理范围内，模型预测值与试验值基本吻合。故选取二次模型作为该 Box-Behnken 试验优化模型。

表4　优化模型的检验与选取

Table 4　Test and selection of the optimization model

模型来源 Model source	模型 *P* 值 Model *P*-value	失拟项 *P* 值 Lack of fit *P*-value	R^2_{Pre}	R^2_{Adj}	可行性 Feasibility
线性模型 Linear model	0.2505	0.0007 **	0.0595	−0.1609	不可行 Unfeasible
双因子交互模型 2FI model	0.8850	0.0004 **	−0.1144	−0.9134	不可行 Unfeasible
二次模型 Quadratic model	<0.0001 **	0.1297	0.9463	0.8574	可行 Feasible
三次模型 Cubic model	0.0369 *	0.6224	0.9829	0.8840	失真 Aliased

* 影响显著 Significant influence ($P<0.05$)；** 影响极显著 Extremely significant influence ($P<0.01$)。表5同 The same for Table 5.

对表3结果进行二次模型方程拟合，得到多元二次回归方程（已编码）：蛋白质提取率 Y(%) = 86.06 + 3.20A + 3.55B + 4.96C + 2.07D − 0.95AB − 1.62AC + 1.29AD − 5.29BC − 5.05BD − 3.63CD − 2.10A2 − 2.55B^2 − 4.66C^2 − 18.33D^2。方程中各项系数绝对值大小反映了相应的因素对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的程度，系数为正值代表其与蛋白质提取率呈正相关，系数为负值则代表其与蛋白质提取率呈负相关。该方程的二次项系数均为负值，初步推断响应面开口向下，在各因素所选水平范围内具有极大值点，能够进行蛋白质提取工艺的优化分析。

由方差分析表5可知，该模型方程相关系数 R^2 为 97.31%，表明试验结果 97.31% 的数据可以用该方程来解释。变异系数（*C. V.*）反映了模型方程的置信度，*C. V.* 越小，则置信度越高，本实验 *C. V.* 仅为 3.32%，进一步说明该方程能够很好地对蛋白质提取率进行分析和预测。各因素按对蛋白质提取率的影响大小排序为：C（提取温度）> B（液料比）> A（NaOH 质量浓度）> D（提取时间）。除模型极显著外，一次项 A，B 和 C，交互项 BC 和 BD，二次项 C^2 和 D^2 表现出极显著影响；一次项 D，交互项 CD，二次项 A^2，B^2 影响显著；交互项 AB，AC 和 AD 影响不

显著。剔除不显著项后可得到新的模型方程：Y(%)=86.06+3.20A+3.55B+4.96C+2.07D-5.29BC-5.05BD-3.63CD-2.10A^2-2.55B^2-4.66C^2-18.33D^2。该方程模型 P 值仍旧小于 0.0001，并且 F 值由 36.22 变为 44.77，失拟项 P 值由 0.1297 变为 0.1329，R^2 和 $C.V.$ 基本不变，表明精简化后方程的预测值与试验值的拟合性更好。

表5 响应面二次模型方差分析

Table 5 Analysis of variance for quadratic response surface regression model

方差来源 Source of variance	平方和 Sum of squares	自由度 *df*	均方 Mean square	*F* 值 *F* value	*P* 值 *P* value
模型 Model	3 119.39	14	222.81	36.22	<0.0001 **
A	122.83	1	122.83	19.97	0.0005 **
B	151.28	1	151.28	24.59	0.0002 **
C	295.74	1	295.74	48.07	<0.0001 **
D	51.64	1	51.64	8.39	0.0117 *
AB	3.64	1	3.64	0.59	0.4546
AC	10.51	1	10.51	1.71	0.2122
AD	6.68	1	6.68	1.09	0.3152
BC	111.94	1	111.94	18.20	0.0008 **
BD	101.97	1	101.97	16.58	0.0011 **
CD	52.79	1	52.79	8.58	0.0110 *
A^2	28.57	1	28.57	4.64	0.0491 *
B^2	42.32	1	42.32	6.88	0.0201 *
C^2	140.74	1	140.74	22.88	0.0003 **
D^2	2 178.53	1	2 178.53	354.13	<0.0001 **
残差 Residual	86.12	14	6.15		
失拟项 Lack of fit	76.85	10	7.69	3.31	0.1297
纯误差 Pure error	9.27	4	2.32		
总误差 Total error	3 205.51	28			
R^2=0.9731	$C.V.$=3.32%				

2.4.2 响应面分析：根据二次模型方程，以黑水虻幼虫蛋白质提取率为响应值，固定2个因素于“0”水平，另外2个因素作为自变量，分别绘制等高线和响应面图。等高线表示同一段圆弧对应的这2个因素所有水平下，蛋白质提取率是相同的。等高线的密度反映蛋白质提取率变化程度，密度越大，相应面越陡，密度越小，响应面越平。等高线的位置与形状反映交互作用的强弱，与对角线垂直度越低，形状趋近于圆表示两因素交互作用对蛋白质提取率影响不显著；与对角线垂直度越高，形状趋近于直线则表示两因素交互作用对蛋白质提取率影响显著。从图2~7可看出，NaOH质量浓度与液料比、NaOH质量浓度与提取温度及NaOH质量浓度与提取时间的交互作用均对蛋白质提取率影响不显著，液料比与提取时间、液料比与提取温度及提取时间与提取温度的交互作用均对蛋白质提取率影响显著。每个响应面均存在最高点，故可以优化出蛋白质最佳提取工艺条件。

由图2可知，提取温度为50℃，提取时间为2 h，固定液料比时，蛋白质提取率随着NaOH质量浓度的增加逐渐上升并趋于平缓，但这种上升的趋势随着液料比的增加逐渐缓慢；固定NaOH质量浓度时，液料比对蛋白质提取率的影响亦呈现相同的趋势。由图3可知，液料比为20 mL/g，提取时间2 h，固定提取温度时，蛋白质提取率随着NaOH质量浓度的增加逐渐上升并趋于平缓，但随着提取温度的升高，蛋白质提取率的上升趋势逐渐变为先缓慢上升再缓慢下降；固定NaOH质量浓度时，提取温度对蛋白质提取率亦呈现相同的趋势。由图4可知，液料比为20 mL/g，提取温度为50℃，固定提取时间时，蛋白质提取率随着NaOH质量浓度的增加逐渐上升，并且这种上升趋势随着时间的延长愈发明显；固定NaOH质量浓度时，蛋白质随着时间的延长先上升后下降，这种趋势随着NaOH质量浓度的增加变化不大。由图5可知，NaOH质量浓度为2.25 g/100 mL，提取时间为2 h，固定提取温度时，蛋白质提取率随着液料比的增加逐渐上升，但随着温度的升高，蛋白质提取率逐渐变为缓慢下降的趋势；固定液料比时，蛋白质提取率随着温度的升高逐渐上升，但随着液料比的增加，蛋白质提取率则呈现出先缓慢上升后缓慢下降的趋势。由图6可知，NaOH质量浓度为2.25 g/100 mL，提取温度为50℃，固定提取时间时，蛋白质提取率随着液料比的增加逐渐上升，但随着时间的延长蛋白质提取率呈现出变化不大甚至略有下降的趋势；固定液料比时，蛋白质提取率随着提取时间的延长先上升后下降，这种趋势随着液料比的增加变化不大。由图7可知，NaOH质量浓度为2.25 g/100 mL，液料比为20 mL/g，固定提取时间时，蛋白质提取率随着提取温度的升高逐渐上升，但随着提取时间的延长，蛋白质提取率则呈现出先缓慢上升后缓慢下降的趋势；固定提取温度时，蛋白质提取率随着提取时间的延长先上升后下降，随着提取温度的升高，这种趋势变化不大。

2.4.3 最佳提取条件的确定：为进一步确定黑水虻幼虫蛋白质提取工艺的最佳条件，通过软件在各因素所选水平范围内进行分析，得到黑水虻幼虫蛋白质提取的最优工艺参数：NaOH质量浓度为

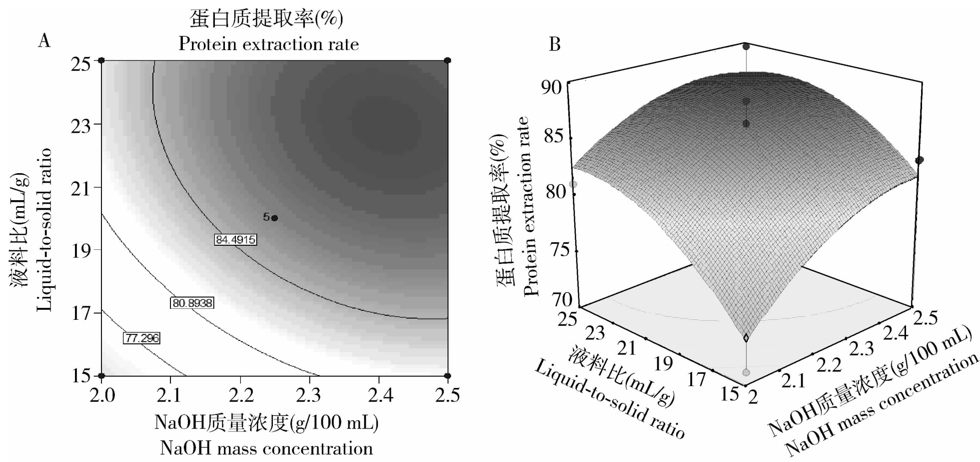


图 2　NaOH 质量浓度与液料比对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的等高线(A)和响应面(B)

Fig. 2　Contour (A) and response surface (B) of the effect of NaOH mass concentration and liquid-to-solid ratio on the extraction rate of proteins from *Hermetia illucens* larvae

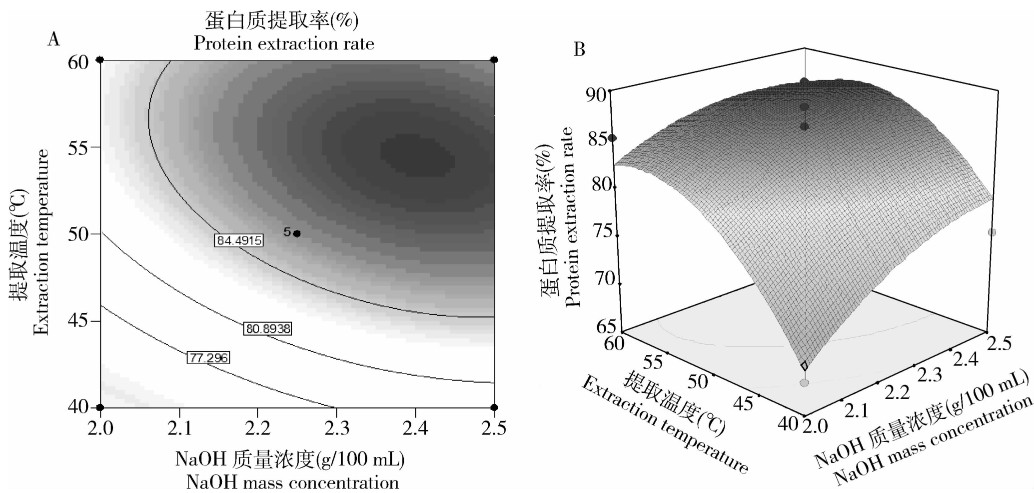


图 3　NaOH 质量浓度与提取温度对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的等高线(A)和响应面(B)

Fig. 3　Contour (A) and response surface (B) of the effect of NaOH mass concentration and extraction temperature on the extraction rate of proteins from *Hermetia illucens* larvae

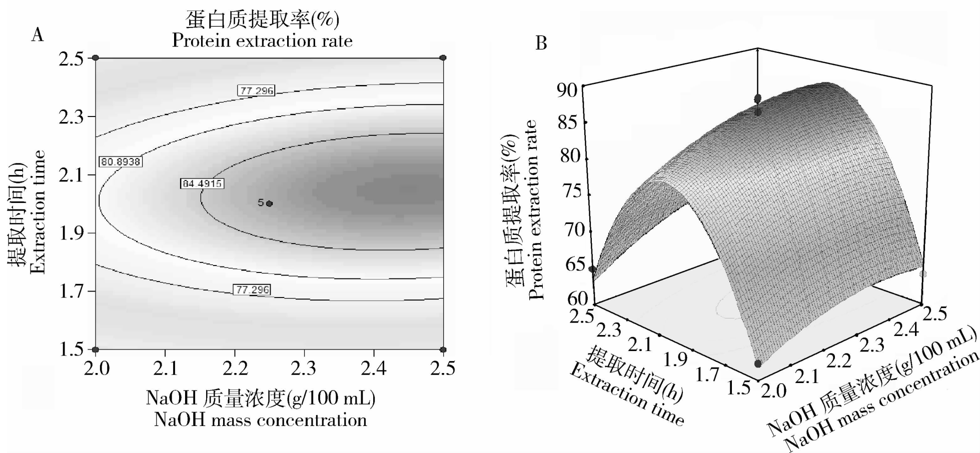


图 4　NaOH 质量浓度与提取时间对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的等高线(A)和响应面(B)

Fig. 4　Contour (A) and response surface (B) of the effect of NaOH mass concentration and extraction time on the extraction rate of proteins from *Hermetia illucens* larvae

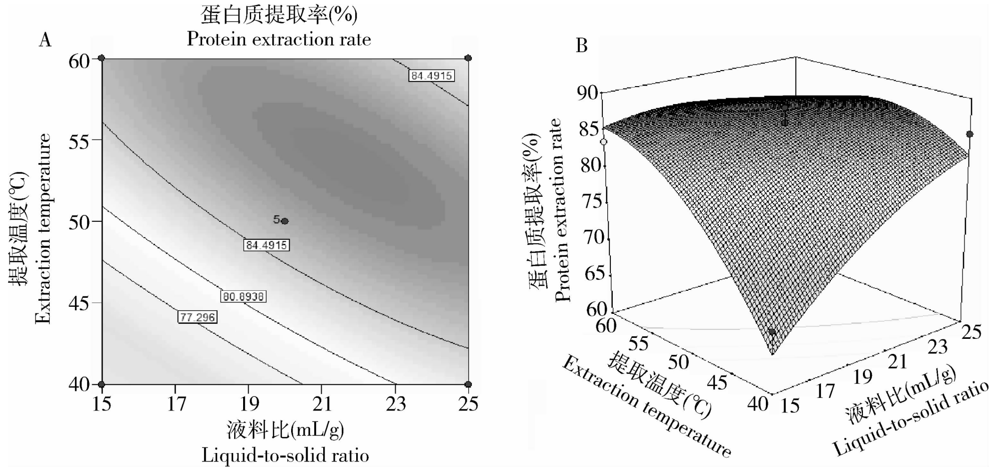


图 5 液料比与提取温度对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的等高线(A)和响应面(B)

Fig. 5 Contour (A) and response surface (B) of the effect of liquid-to-solid ratio and extraction temperature on the extraction rate of proteins from *Hermetia illucens* larvae

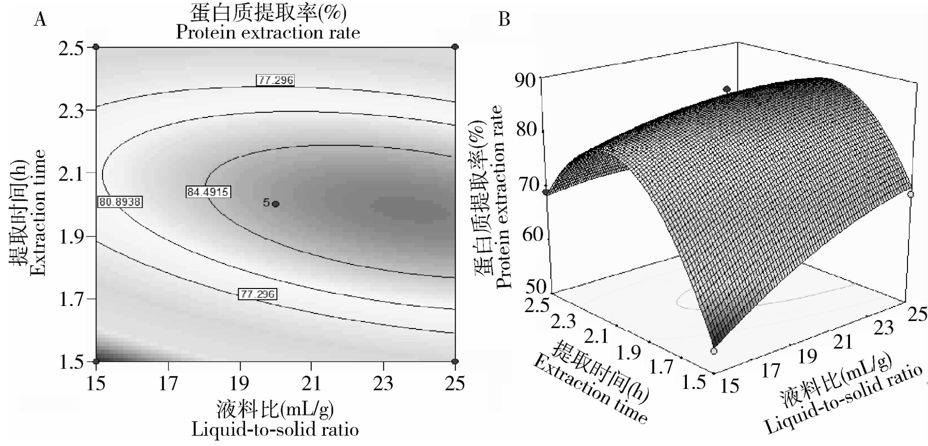


图 6 液料比与提取时间对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的等高线(A)和响应面(B)

Fig. 6 Contour (A) and response surface (B) of the effect of liquid-to-solid ratio and extraction time on the extraction rate of proteins from *Hermetia illucens* larvae

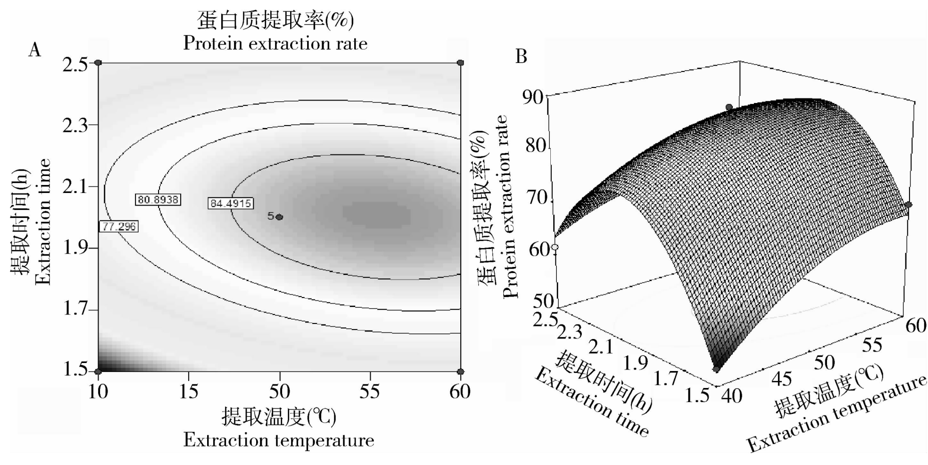


图 7 提取温度与提取时间对黑水虻幼虫蛋白质提取率影响的等高线(A)和响应面(B)

Fig. 7 Contour (A) and response surface (B) of the effect of extraction temperature and extraction time on the extraction rate of proteins from *Hermetia illucens* larvae

2.44 g/100 mL，液料比为 21.94 mL/g，提取温度为 53.24℃，提取时间为 1.98 h。在此条件下，按照模型方程预测出黑水虻幼虫蛋白质理论值为88.74%。然而考虑到实际操作条件，最终将最优提取工艺参数确定为：NaOH 质量浓度 2.44 g/100 mL，液料比 22 mL/g，提取温度 53℃，提取时间 2 h。在此最佳提取条件下，进行 3 次平行验证试验，实际测得黑水虻幼虫蛋白质提取率为 88.49%，与理论值相对误差仅为 0.28%，证明该响应面试验法优化得到的提取工艺参数是可靠的，具有实用价值。

3　讨论

黑水虻幼虫饲养成本低，有利于环境改善，并且蛋白质含量丰富。对黑水虻幼虫全粉和脱脂粉进行了主要成分分析，发现其蛋白质含量丰富，黑水虻幼虫全粉蛋白含量 32.79%，脱脂粉中蛋白含量高达 57.7%。

首次对黑水虻幼虫进行了蛋白质的提取，通过比较碱提法、酶提法、盐提法和 Tris-HCl 缓冲液提法 4 种提取方法的蛋白质提取率，确定碱提法为较优的黑水虻幼虫蛋白质提取方法。并以 NaOH 质量浓度、液料比、提取温度和提取时间为因素依次进行了单因素试验和四因素三水平 Box-Behnken 响应面试验，并建立二次模型方程。方差分析表明，不仅该模型极显著，NaOH 质量浓度、液料比、提取温度及提取时间 4 个因素也达到极显著水平，各因素对黑水虻蛋白质提取率影响程度依次为：提取温度 > 液料比 > NaOH 质量浓度 > 提取时间。利用软件对各交互项的等高线和响应面图及模型方程进行了综合分析，结合实际情况，确定了黑水虻幼虫蛋白质提取的最优工艺参数：NaOH 质量浓度 2.44 g/100 mL，液料比 22 mL/g，提取温度 53.2℃，提取时间 2 h。按此条件做验证试验，结果实测值为 88.49%，与理论值相差 0.28%，该模型能很好地预测黑水虻幼虫蛋白质实际提取率。

对获得的黑水虻幼虫蛋白质进行提取是其理化特性和功能活性的研究工作的基础，有利于充分利用这一昆虫蛋白资源，缓解蛋白质资源短缺的压力。

参考文献（References）

Ansharullah, James AH, Colin FC, 1997. Application of carbohydrases in extracting protein from rice bran. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 74(2): 141－146.

Chai ZQ, Wang FB, Guo MF, Wei QH, Chen XF, 2012. Research of Stratiomyidae and its utilization. *Guangdong Agricultural Sciences*, (10): 182－186.［柴志强，王付彬，郭明昉，魏庆辉，陈小凤，2012. 水虻科昆虫及其资源化利用研究. 广东农业科学，(10)：182－186］

Choi WH, Yun JH, Chu JP, Chu KB, 2012. Antibacterial effect of extracts of *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae) larvae against Gram-negative bacteria. *Entomological Research*, 42(5): 219－226.

Diener S, Zurbrügg C, Tockner K, 2009. Conversion of organic material by black soldier fly larvae: establishing optimal feeding rates. *Waste Management & Research*, 27(6): 603－610.

Erickson MC, Islam M, Sheppard C, Liao J, Doyle MP, 2004. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 and *Salmonella enterica* serovar enteritidis in chicken manure by larvae of the black soldier fly. *Journal of Food Protection*, 67(4): 685－690.

Guo Q, Zhang JX, He GM, Liu N, 2011. Study on extraction and antioxidant activity analysis of barley pest protein. *Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica*, 20(2): 188－192.［郭倩，张建新，何桂梅，刘娜，2011. 大麦虫蛋白质的提取分离及抗氧化性研究. 西北农业学报，20(2)：188－192］

Guo XF, Chen JL, Lin Y, Qin ZH, Liao XJ, Hu XS, Wu JH, 2012. Extraction and characterization of protein from cold pressed and traditional pressed degreased walnut dregs. *Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering*, 28(18): 287－292.［郭兴峰，陈计峦，林燕，秦子涵，廖小军，胡小松，吴继红，2012. 热榨和冷榨核桃饼粕中蛋白质提取及其性质研究. 农业工程学报，28(18)：287－292］

Jin HX, Xie SA, Shi RJ, Tang YZ, Wang FY, 2012. Comparison of chemical extraction methods of the proteins from the larva of *Cryptotympana pustulata*. *Journal of Northwest Forestry University*, 27(6): 128－130.［金会鑫，谢寿安，史睿杰，汤耀宗，王翻艳，2012. 不同方法提取蚱蝉若虫蛋白质效果比较. 西北林学院学报，27(6)：128－130］

Lalander C, Diener S, Magri ME, Zurbrügg C, Lindström A, Vinnerås B, 2013. Faecal sludge management with the larvae of the black soldier fly (*Hermetia illucens*) － from a hygiene aspect. *Science of the Total Environment*, 458－460: 312－318.

Li Q, Zheng LY, Cai H, Garza E, Yu ZN, Zhou SD, 2011a. From organic waste to biodiesel: black soldier fly, *Hermetia illucens*, makes it feasible. *Fuel*, 90(4): 1545－1548.

Li Q, Zheng LY, Qiu N, Cai H, Tomberlin JK, Yu ZN, 2011b. Bioconversion of dairy manure by black soldier fly (Diptera: Stratiomyidae) for biodiesel and sugar production. *Waste Management*, 31(6): 1316－1320.

Li ZG, Tan LH, Lai JX, Long YZ, Wang G, 2011. Application prospects of the tropical agricultural waste biotransformation using black soldier fly. *Journal of Tropical Organisms*, 2(3): 287－290.［李志刚，谭乐和，赖剑雄，龙宇宙，王干，2011. 利用黑水虻生物转化热带农业废弃物的应用前景. 热带生物学报，2(3)：287－290］

Liu GQ, Wei MC, 2008. Advances in utilization and development of

insects resources. *Journal of Northwest Forestry University*, 23(6): 142 – 146. [刘高强, 魏美才, 2008. 昆虫资源开发与利用的新进展. 西北林学院学报, 23(6): 142 – 146]

Liu Y, Zou TT, Song HL, 2013. Optimization of protein extraction of watermelon seed by response surface methodology. *Science and Technology of Food Industry*, 34(3): 250 – 254. [刘野, 邹婷婷, 宋焕禄, 2013. 响应曲面法优化西瓜籽蛋白提取工艺. 食品工业科技, 34(3): 250 – 254]

Newton L, Sheppard C, Waston DW, Burtle G, Dove R, 2005. Using the black soldier fly, *Hermetia illucens*, as a value-added tool for the management of swine manure [EB/OL]. (2005-06-06) [2013-11-26]. http://www.cals.ncsu.edu/waste_mgt/smithfield_projects/phase2report05/cd,web%20files/A2.pdf.

Nie L, Zhang JX, Peng XH, Wang X, Huang XY, 2011. Extraction optimization and antioxidant activity of water-soluble protein from *Chirocephalus diaphanous*. *Food Science*, 32(24): 26 – 30. [聂路, 张建新, 彭鑫华, 王欣, 黄晓燕, 2011. 丰年虫蛋白质的分类提取工艺优化及抗氧化活性. 食品科学, 32(24): 26 – 30]

Shen LQ, Huang GR, Wang XY, Wang ZY, 2007. Extraction of protein in tea residue by alkali method. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 7(6): 108 – 112. [沈莲清, 黄光荣, 王向阳, 王忠英, 2007. 茶渣中蛋白质的碱法提取工艺研究. 中国食品学报, 7(6): 108 – 112]

Shen Y, Xu QY, An XC, 2012. The study of stress resistance for larva and pre-pupa stage of black soldier fly, *Hermetia illucens*. *Journal of Environmental Entomology*, 34(2): 240 – 242. [沈媛, 徐齐云, 安新城, 2012. 黑水虻幼虫及预蛹抗逆性的初步研究. 环境昆虫学报, 34(2): 240 – 242]

Wang Y, 2012. A study on protein extraction on Sichuan Chauliodinae. *The Food Industry*, 33(5): 31 – 33. [王燕, 2012. 四川鱼蛉蛋白质提取工艺研究. 食品工业, 33(5): 31 – 33]

Xia Q, Zhao QF, Liao Y, Zhu W, Yu GH, Chen YF, Song MY, 2013. Black soldier fly antimicrobial peptides induced conditions optimization and research of crude extracts activity. *Journal of Environmental Entomology*, 35(1): 44 – 48. [夏嫱, 赵启凤, 廖业, 朱伟, 喻国辉, 陈远凤, 宋明英, 2013. 黑水虻抗菌肽诱导条件优化及粗提物活性研究. 环境昆虫学报, 35(1): 44 – 48]

Yu GH, Chen YH, Yu ZN, Cheng P, 2009. Research progression on the larvae and prepupae of black soldier fly *Hermetia illucens* used as animal feedstuff. *Chinese Bulletin of Entomology*, 46(1): 41 – 45. [喻国辉, 陈燕红, 喻子牛, 程萍, 2009. 黑水虻幼虫和预蛹的饲料价值研究进展. 昆虫知识, 46(1): 41 – 45]

Zhang WQ, Wang YS, Wang J, Zheng XX, 2008. Insect resources and social & economic development. *Journal of Environmental Entomology*, 30(4): 357 – 360. [张文庆, 汪延生, 王娟, 郑小霞, 2008. 昆虫资源与社会经济发展. 环境昆虫学报, 30(4): 357 – 360]

Zhao CX, Zhu HJ, Zhang YN, 2013. Optimization by orthogonal array design of protein extraction from pupae of *Zophobas morio*. *Food Science*, 34(16): 42 – 45. [赵晨霞, 祝海娟, 张翌楠, 2013. 正交试验优化大麦虫蛋白质提取工艺. 食品科学, 34(16): 42 – 45]

Zheng LY, Li Q, Zhang JB, Yu ZN, 2012. Double the biodiesel yield: rearing black soldier fly larvae, *Hermetia illucens*, on solid residual fraction of restaurant waste after grease extraction for biodiesel production. *Renewable Energy*, 41: 75 – 79.

(责任编辑: 赵利辉)